

**JP06169780A****MicroPatent Report****GENE DNA PARTICIPATING IN INTEGRATION OF  
MEMBRANE PROTEIN TO MEMBRANE**

<p><b>[71] Applicant:</b> MITSUBISHI PETROCHEM CO LTD</p> <p><b>[72] Inventors:</b> HONNO NOBUTAKE; KOBAYASHI MIKI; YUGAWA HIDEAKI</p> <p><b>[21] Application No.:</b> JP04326927</p> <p><b>[22] Filed:</b> 19921207</p> <p><b>[43] Published:</b> 19940621</p> <p><b><u>Go to Fulltext</u></b></p>	<p><b>[No drawing]</b></p>
<p><b>[57] Abstract:</b> PURPOSE: To obtain a gene DNA derived from coryneform bacteria effective for participating in an integration of membraneous protein to membrane. CONSTITUTION: A secY gene DNA is isolated from Brevibacterium flavum MJ-233. The base sequence of the gene is determined and stable plasmid pCRY 30-secY is formed in the coryneform bacteria having this gene DNA segment.</p> <p><b>[51] Int'l Class:</b> C12N01531 C07K01300 C12N00121 C12N01577 C12P02102 C12N00121 C12R00113 C12P02102 C12R00113</p>	

(19)日本国特許庁(JP)

## (12) 公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-169780

(43)公開日 平成6年(1994)6月21日

(51)Int.Cl. <sup>5</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 15/31	Z N A			
C 0 7 K 13/00		8517-4H		
C 1 2 N 1/21		7236-4B		
15/77				
		8931-4B	C 1 2 N 15/ 00	A

審査請求 未請求 請求項の数 8(全 14 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平4-326927

(22)出願日 平成4年(1992)12月7日

特許法第30条第1項適用申請有り 平成4年11月17日  
 社団法人日本生物工学会開催の「平成4年度日本生物工  
 学会大会」において文書をもって発表

(71)出願人 000006057

三菱油化株式会社

東京都千代田区丸の内二丁目5番2号

(72)発明者 谷野 信剛

茨城県稲敷郡阿見町中央8丁目3番1号

三菱油化株式会社筑波総合研究所内

(72)発明者 小林 幹

茨城県稲敷郡阿見町中央8丁目3番1号

三菱油化株式会社筑波総合研究所内

(72)発明者 湯川 英明

茨城県稲敷郡阿見町中央8丁目3番1号

三菱油化株式会社筑波総合研究所内

(74)代理人 弁理士 山本 隆也

(54)【発明の名称】 膜蛋白質の膜への組み込みに関与する遺伝子DNA

(57)【要約】 (修正有)

【目的】 コリネ型細菌由来の膜蛋白質の膜への組み込  
 みに関与する遺伝子DNAの提供。

【構成】 プレバクテリウム・フラバムMJ-233  
 からセックワイ(secY)遺伝子DNAを単離し、こ  
 の遺伝子の塩基配列を決定し、該遺伝子DNA断片を有  
 するコリネ型細菌内で安定なプラスミドpCRY30-  
 secYを構築した。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 コリネ型細菌由来の膜蛋白質の膜への組み込みに関与する遺伝子DNA。

【請求項2】 コリネ型細菌がプレビバクテリウム・フラバム (*Brevibacterium flavu*

m) MJ233である請求項1記載の遺伝子DNA。

【請求項3】 膜蛋白質の膜への組み込みに関与する遺伝子がセックワイ (secY) である請求項1記載の遺伝子DNA。

【請求項4】 次のDNA塩基配列で示されるセックワイ (secY) 遺伝子DNA。

```

GTGTCGCCA TTATTCAGGC ATTCAAGGAC GCGATCTGC GTAAGAAGAT TTTCTTCACT 60
ATCGCAATGA TCGTTCTATA CCGCATCGGT GCGCAGATCC CTTCGCCGGG AGTTGACTAT 120
GCAACGATTA GTGGTCGTCT GCGTGACTTG ACTCAGGATC AGTCAAGCGT TTATTCGCTG 180
ATTAACCTGT TTTCGGTGG AGCGCTGCTG CAGCTGTCCA TTTTGTCTAT TGGTATCATG 240
CCGTACATCA CCGCGTCTAT TATCGTGACG CTGCTGACTG TGGTTATTCC ACACTTTGAG 300
GAGTTGAAGA AGGAAGGCCA GTCTGGCCAG GCGAAGATGA TGCAGTACAC CAGGTACTTA 360
ACGGTTGCCT TGGCGTTGCT TCAGTCTTCG GGCATCGTCG CGTTGGGGGA CCGTGAGCAG 420
CTGCTTGGCG CAGGCATTCT GCTGCTGTCG GCTGATCGCA ACTCTTCTGA CCTCATTGTT 480
TTGGTCATCA CCATGACTGC GGGTGCACTG CTTGTGATGT GGATGGGTGA GCTCATCACG 540
GAAAAGGGCG TAGGCAATGG TATGTCGCTG CTGATTTTCG CTGGTATCGC AACTCGGCTC 600
CCAACTGATG GCATGAACAT TCTGGGCAAC TCCGGCGGCG TGGTTTTGCG TGTGTTCTG 660
GCTTCGGTTC TGATCCTGGT CATTGGTGTT GTATTGCTTG AGCAGGGCCA GCGTCGTATT 720
CCAGTGCAGT ACGCAAAGCG CATGGTGGGT CGTCGTCAGT ACGGTGGTTC TTCCACTTAC 780
CTGCCITTGA AGGTCAACCA AGCTGGTGTT ATCCAGTGA TCCTCGCGTC TTCTTGATT 840
TACATGCCAG TGCTGATTAC TCAGATCGTG AACTCTGGTT CGCTGGAAGT GTCTGATAAC 900
TGGTGGCAGC GCAACATCAT TGGGCACCTG CAGACGCCTT CTCTCTGGCA GTACATTGTT 960
TTGTACTTTG CACTGACCAT CTCTCTCTCT TACTTCTATG TTTCTGTTCG GTATGATCCA 1020
GCTGAGCAGG CTGAAACAT GAAGAAGTAC GCGGATTITA TCCCTGGTAT TCGTCCGGGG 1080
CGTCCGACTG CTGAGTACTT GGGATTGCTC ATGAACCGCC TGCTGTTTGT TGGTTCCTCT 1140
TACCTGGCTG TCATTGCTGT GCTGCCAAAC ATTATGCTGG ATCTAGGTGT TGACGCCGGT 1200
TCGGCCGGAG CAACTCCATT CGGCGGAACC GCAATCTTGA TTCTTGATAT TGTGCACTG 1260
ACCACAGTGA AGCAGATTGA GAGCCAGCTC CTGCAAAGCA ACTACGAAGG ACTTCTAAAA 1320
TAA

```

【請求項5】 次のアミノ酸配列で示されるセックワイ (secY) 遺伝子DNA。

```

Val Ser Ala Ile Ile Gln Ala Phe Lys Asp Ala Asp Leu Arg Lys Lys
1           5           10          15
Ile Phe Phe Thr Ile Ala Met Ile Val Leu Tyr Arg Ile Gly Ala Gln
20          25          30
Ile Pro Ser Pro Gly Val Asp Tyr Ala Thr Ile Ser Gly Arg Leu Arg
35          40          45
Asp Leu Thr Gln Asp Gln Ser Ser Val Tyr Ser Leu Ile Asn Leu Phe
50          55          60
Ser Gly Gly Ala Leu Leu Gln Leu Ser Ile Phe Ala Ile Gly Ile Met
65          70          75          80
Pro Tyr Ile Thr Ala Ser Ile Ile Val Gln Leu Leu Thr Val Val Ile
85          90          95
Pro His Phe Glu Glu Leu Lys Lys Glu Gly Gln Ser Gly Gln Ala Lys
100         105         110
Met Met Gln Tyr Thr Arg Tyr Leu Thr Val Ala Leu Ala Leu Leu Gln
115         120         125
Ser Ser Gly Ile Val Ala Leu Ala Asp Arg Glu Gln Leu Leu Gly Ala
130         135         140
Gly Ile Arg Val Leu Ser Ala Asp Arg Asn Phe Phe Asp Leu Ile Val
145         150         155         160

```

Leu Val Ile Thr Met Thr Ala Gly Ala Val Leu Val Met Trp Met Gly  
 165 170 175  
 Glu Leu Ile Thr Glu Lys Gly Val Gly Asn Gly Met Ser Leu Leu Ile  
 175 180 185  
 Phe Ala Gly Ile Ala Thr Arg Leu Pro Thr Asp Gly Met Asn Ile Leu  
 190 195 200  
 Gly Asn Ser Gly Gly Val Val Phe Ala Val Val Leu Ala Ser Val Leu  
 205 210 215  
 Ile Leu Val Ile Gly Val Val Phe Val Glu Gln Gly Gln Arg Arg Ile  
 220 225 230 235  
 Pro Val Gln Tyr Ala Lys Arg Met Val Gly Arg Arg Gln Tyr Gly Gly  
 240 245 250  
 Ser Ser Thr Tyr Leu Pro Leu Lys Val Asn Gln Ala Gly Val Ile Pro  
 255 260 265  
 Val Ile Phe Ala Ser Ser Leu Ile Tyr Met Pro Val Leu Ile Thr Gln  
 270 275 280  
 Ile Val Asn Ser Gly Ser Leu Glu Val Ser Asp Asn Trp Trp Gln Arg  
 285 290 295  
 Asn Ile Ile Ala His Leu Gln Thr Pro Ser Ser Trp Gln Tyr Ile Val  
 300 305 310 315  
 Leu Tyr Phe Ala Leu Thr Ile Phe Phe Ser Tyr Phe Tyr Val Ser Val  
 320 325 330  
 Gln Tyr Asp Pro Ala Glu Gln Ala Glu Asn Met Lys Lys Tyr Gly Gly  
 335 340 345  
 Phe Ile Pro Gly Ile Arg Pro Gly Arg Pro Thr Ala Glu Tyr Leu Gly  
 350 355 360  
 Phe Val Met Asn Arg Leu Leu Phe Val Gly Ser Leu Tyr Leu Ala Val  
 365 370 375  
 Ile Ala Val Leu Pro Asn Ile Met Leu Asp Leu Gly Val Asp Ala Gly  
 380 385 390 400  
 Ser Ala Gly Ala Thr Pro Phe Gly Gly Thr Ala Ile Leu Ile Leu Val  
 405 410 415  
 Ser Val Ala Leu Thr Thr Val Lys Gln Ile Glu Ser Gln Leu Leu Gln  
 420 425 430  
 Ser Asn Tyr Glu Gly Leu Leu Lys  
 435 440

【請求項6】 請求項1～5のいずれかに記載の遺伝子DNAが導入された組換えプラスミド。

【請求項7】 請求項1～5のいずれかに記載の遺伝子DNAと、コリネ型細菌内で複製増殖機能を司る遺伝子を含むDNAを保有する組換えプラスミド。

【請求項8】 請求項7記載のプラスミドで形質転換されたコリネ型細菌。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、コリネ型細菌由来の膜蛋白質の膜への組み込みに関与する遺伝子DNAに関し、さらに詳しくは膜蛋白質の膜への組み込みに関与する主要な遺伝子の1つセックワイ (secY) 遺伝子に関する。secY遺伝子産物は、膜蛋白質、分泌蛋白質

が各々、細胞膜内へ組み込まれる、菌体外へ分泌される過程に必要不可欠な遺伝子である。該遺伝子を利用することにより、膜蛋白質の膜中含量の増加、分泌蛋白質の菌体外分泌量の増加が期待される。また、膜蛋白質、例えば酸化還元酵素の含量増加により、高活性を有する高性能生体触媒として菌体を利用し、部位特異的酸化還元等による様々の物質生産に応用することが可能である。

【0002】

【従来技術】 蛋白質の膜への組み込み及び分泌に関する機構は、エシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) においてよく研究されており [Annual Review Genetics 24, 215-248, 1990. Annual Review of Biochemistry, 60, 101-124,

1991]、蛋白質の膜への組み込みに関する遺伝子としてsecA [Journal of Bacteriology, 150, 686-691, 1982]、secB [Journal of Bacteriology, 154, 254-260, 1983]、secD [Journal of Bacteriology, 169, 1286-1290, 1987]、secE [Genetics; 118, 571-579, 1988]、secF [EMBO Journal, 9, 3209-3216, 1990]、secY [Nucleic Acids Research, 11, 2599-2616, 1983] 等が知られている。

【0003】これらの中でsecA, E, Y遺伝子は、各種変異株を用いた研究により蛋白質の膜への組み込みに関与する重要な役割を演じていることが示されている。上記secY遺伝子としては、エシエリヒア・コリ (*Escherichia coli*) 由来の遺伝子 [Nucleic Acids Research, 11, p. 2599-2616, 1983参照]、バチルス・サチルス (*Bacillus subtilis*) 由来の遺伝子 [Journal of Biochemistry, 107, p. 603-607, 1990参照] 等が単離されている。しかしながら、産業上重要な細菌であるコリネ型細菌由来のsecY遺伝子については、従来の報告例は見当たらない。

【0004】一般に、膜蛋白質は細胞膜中より抽出した場合不安定であり、生体触媒として利用するには限界がある。特定膜蛋白質の膜中含量のみを増加させることが可能であれば、高含量の膜、もしくは微生物自体を触媒として利用することができる。しかしながら、膜蛋白質を微生物細胞内で高発現させても、細胞質内でインクルージョン・ボディ (inclusion body) を形成し、細胞膜内へ組み込まれない。膜蛋白質を高発現させ、膜内に安定に保持させるためには、蛋白質の膜への組み込み系を強化する必要があると考えられるが、コリネ型細菌由来の膜組み込み系についての知見がなく、また、多種由来の膜組み込み系は、コリネ型細菌中で十分に機能しないと考えられる [Molecular Microbiology, 4, 305-314, 1990, FEBS Letters, 273, 75-78, 1990参照]。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】本発明者らは、上記問題を解決すべく、鋭意研究を重ねた結果、コリネ型細菌由来の膜蛋白質の膜への組み込みに関与する遺伝子を単離し、改変することにより、特定膜蛋白質の膜中含量増加を達成できると考え、コリネ型細菌由来の膜蛋白質の膜への組み込みに関与する主要な遺伝子であるsecY遺伝子DNAを単離することに成功し、本発明を完成するに至った。

【0006】

【課題を解決するための手段】かくして本発明によれば、(1) コリネ型細菌由来の膜蛋白質の膜への組み込みに関与する遺伝子DNA、(2) 該遺伝子DNAが導入された組換えプラスミド及び(3) 該組換えプラスミドで形質転換されたコリネ型細菌が提供される。

【0007】以下、本発明についてさらに詳細に説明する。本発明の「膜蛋白質の膜への組み込みに関与する遺伝子DNA」とは、細胞膜中蛋白質の膜への組み込み、菌体外分泌蛋白質の分泌に関与する装置を構成する主要成分をコードする遺伝子DNAを意味するものである。該主要成分をコードする遺伝子DNAであるsecY遺伝子DNAを含むDNA断片 (以下、これを「A断片」と略称することがある) は、その塩基配列が決定された後においては合成することも可能であるが、通常は微生物からクローニングされる場合が多く、その供給源となる微生物としては、コリネ型細菌が有利に使用される。

【0008】これらの供給源微生物からA断片を調製するための基本操作の一例を述べれば次のとおりである：A断片は、上記コリネ型細菌、例えばブレヴィバクテリウム・フラバム (*Brevibacterium flavum*) MJ-233 (FERM BP-1497) 株の染色体上に存在し、この染色体を適当な制限酵素で切断することにより生ずる切断断片の中から以下に述べる方法で、分離取得することができる。

【0009】まず、ブレヴィバクテリウム・フラバムMJ-233株の培養物から染色体DNAを抽出する。この染色体DNAを適当な制限酵素、例えばEcoRIを用いて染色体DNAを完全に分解する。得られるDNA断片をクローニングベクター、例えばpUC118 (宝酒造製) に挿入し、このベクターを用いてエシエリヒア・コリJM109 (宝酒造製) を形質転換し、形質転換体を取得する。

【0010】得られる形質転換体よりプラスミドDNAを抽出し、エシエリヒア・コリ、バチルス・サチルス由来secY遺伝子の共通領域配列をプローブとして用いるサザンハイブリダイゼーションにより、挿入されたブレヴィバクテリウム・フラバムMJ-233株染色体由来のA断片を確認・取得することができる。かくして得られるA断片をさらに適当な制限酵素を用いて切断し、得られるDNA断片を同種のベクターに挿入し、エシエリヒア・コリJM109を形質転換する。得られる形質転換体よりプラスミドDNAを抽出し、ハイブリダイゼーションにより挿入されたブレヴィバクテリウム・フラバムMJ-233株染色体由来のA断片を確認・取得することができる。

【0011】このようにして得られるA断片の一つは、上記ブレヴィバクテリウム・フラバムMJ-233株の染色体DNAを制限酵素EcoRIの完全分解により切り出し、さらにそれを制限酵素KpnIで切断又は制限酵

素KpnIで直接切断することによって得られる大きさが約1.5kbのDNA断片を挙げることができる。この約1.5kbのsecY遺伝子DNAを含むDNA断片を、各種の制限酵素で切断したときの認識部位数及び切断断片の大きさを下記第1表に示す。

【0012】

【表1】

第1表

制限酵素	認識部位数	切断断片の大きさ (kb)
BalI	1	0.4, 1.1
PstI	2	0.3, 0.5, 0.7
SacI	1	0.6, 0.9
SmaI	1	0.2, 1.3

【0013】なお、本明細書において、制限酵素による「認識部位数」は、DNA断片又はプラスミドを、制限酵素の存在下で完全分解し、それらの分解物をそれ自体既知の方法に従い1%アガロースゲル電気泳動および5%ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供し、分離可能な断片の数から決定した値を採用した。

【0014】また、「切断断片の大きさ」及びプラスミドの大きさは、アガロースゲル電気泳動を用いる場合には、エシェリヒア・コリのラムダファージ(λ phage)のDNAを制限酵素HindIIIで切断して得られる分子量既知のDNA断片の同一アガロースゲル上での泳動距離で描かれる標準線に基づき、また、ポリアクリルアミドゲル電気泳動を用いる場合には、エシェリヒア・コリのファイ・エックス174ファージ(φx174 phage)のDNAを制限酵素HaeIIIで切断して得られる分子量既知のDNA断片の同一ポリアクリルアミドゲル上での泳動距離で描かれる標準線に基づき、切断DNA断片又はプラスミドの各DNA断片の大きさを算出する。プラスミドの大きさは、切断断片のそれぞれの大きさを加算して求める。なお、各DNA断片の大きさの決定において、1kb以上の断片の大きさについては、1%アガロースゲル電気泳動によって得られる結果を採用し、約0.1kbから1kb未満の断片の大きさについては4%ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって得られる結果を採用した。

【0015】一方、上記のプレバクテリウム・フラバムMJ-233の染色体DNAを制限酵素EcoRI、KpnIによって切断又は制限酵素KpnIで直接切断することにより得られる大きさが約1.5kbのDNA断片については、その塩基配列をプラスミドpUC118またはpUC119(宝酒造製)を用いるジデオキシスクレオチド酵素法(dideoxy chain termination法、Sanger, F. et. al., Proc. Natl. Acad. Sci. US A, 74, 5463, 1977)により決定することができる。このようにして決定した上記約1.5kbのDNA断片の塩基配列のオープンリーディングフレームの

存在から決定したsecY遺伝子DNAは、後記配列表の配列番号1に示す配列を有するものであり、440個のアミノ酸をコードする1320の塩基対から構成される。

【0016】上記の塩基配列を包含する本発明のsecY遺伝子を含むDNA断片は、天然のコリネ型細菌染色体DNAから分離されたもののみならず、通常用いられるDNA合成装置、例えばベックマン社製System-1 Plusを用いて合成されたものであってもよい。

【0017】また、前記の如くプレバクテリウム・フラバムMJ-233の染色体DNAから取得される本発明の膜蛋白質の膜への組み込みに関与する遺伝子DNAは、secY遺伝子産物の機能を実質的に損なうことがない限り、塩基配列の一部の塩基が他の塩基と置換されていてもよく又は削除されていてもよく、或いは新たに塩基が挿入されていてもよく、さらに塩基配列の一部が転位されているものであってもよく、これらの誘導体のいずれもが、本発明の遺伝子DNAに包含されるものである。

【0018】以上に詳述した大きさが約1.5kbのDNA断片の制限酵素による切断点地図を図1に示す。本発明のsecY遺伝子DNAを含むDNA断片(A断片)は、適当なプラスミド、例えば、コリネ型細菌内でプラスミドの複製増殖機能を司る遺伝子を少なくとも含むプラスミドベクターに導入することにより、コリネ型細菌内でsecY遺伝子産物の高発現可能な組換えプラスミドを得ることができる。

【0019】また、本発明のsecY遺伝子を発現させるためのプロモーターはコリネ型細菌が保有するプロモーターであることができるが、それに限られるものではなく、secY遺伝子の転写を開始させるための原核生物由来の塩基配列であればいかなるプロモーターであってもよい。

【0020】本発明のA断片を導入することができる、コリネ型細菌内での複製増殖機能を司る遺伝子を少なくとも含むプラスミドベクターとしては、例えば、特開平3-210184号公報に記載のプラスミドpCRY30;特開平2-276575号公報に記載のプラスミドpCRY21、pCRY2KE、pCRY2KX、pCRY31、pCRY3KE及びpCRY3KX;特開平1-191686号公報に記載のプラスミドpCRY2及びpCRY3;特開昭58-67679号公報に記載のpAM330;特開昭58-77895号公報に記載のpHM1519;特開昭58-192900号公報に記載のpAJ655、pAJ611及びpAJ1844;特開昭57-134500号に記載のpCG1;特開昭58-35197号公報に記載のpCG2;特開昭57-183799号公報に記載のpCG4及びpCG11等を挙げることができる。

【0021】中でもコリネ型細菌の宿主ベクター系で用いられるプラスミドベクターとしては、コリネ型細菌内でプラスミドの複製増殖機能を司る遺伝子とコリネ型細菌内でプラスミドの安定化機能を司る遺伝子を持つものが好ましく、例えば、プラスミドpCRY30、pCRY21、pCRY2KE、pCRY2KE、pCRY2KX、pCRY31、pCRY3KE及びpCRY3KX等が好適に使用される。

【0022】上記プラスミドベクターpCRY30を調製する方法としては、ブレヴィバクテリウム・スタチオニス (Brevibacterium stationis) IFO12144 (FERM BP-2515) からプラスミドpBY503 (このプラスミドの詳細については特開平1-95785号公報参照) DNAを抽出し、制限酵素XhoIで大きさが約4.0 kbのプラスミドの複製増殖機能を司る遺伝子を含むDNA断片を切り出し、制限酵素EcoRIおよびKpnIで大きさが約2.1 kbのプラスミドの安定化機能を司る遺伝子を含むDNA断片を切り出す。これらの両断片をプラスミドpHSG298 (宝酒造製) のEcoRI-KpnI部位及びSalI部位に組み込むことにより、プラスミドベクターpCRY30を調製することができる。

【0023】次に、上記プラスミドベクターへの本発明のA断片の導入は、例えばプラスミドベクター中に1箇所だけ存在する制限酵素部位を、該制限酵素で開裂し、そこに前記A断片および開裂したプラスミドベクターを必要に応じてS1ヌクレアーゼで処理して平滑末端とするか、または適当なアダプターDNAの存在下にDNAリガーゼ処理で連結させることにより行うことができる。

【0024】プラスミドpCRY30への本発明のA断片の導入は、プラスミドpCRY30を制限酵素EcoRIで開裂させ、そこに前記secY遺伝子DNAを含むDNA断片 (A断片) をDNAリガーゼで連結させることにより行うことができる。このようにして造成されるプラスミドpCRY30に本発明の大きさが約1.5 kbのA断片を導入した組換えプラスミドをpCRY30-secYと命名した。プラスミドpCRY30-secYの作成方法の詳細については、後記実施例4で説明する。

【0025】本発明によるプラスミドで形質転換しうる宿主微生物としては、コリネ型細菌、例えばブレヴィバクテリウム・フラバムMJ-233 (FERM BP-1497)、ブレヴィバクテリウム・フラバムMJ-233-AB-41 (FERM BP-1498)、ブレヴィバクテリウム・フラバムMJ-233-ABT-11 (FERM BP-1500)、ブレヴィバクテリウム・フラバムMJ-233-ABD-21 (FERM BP-1499) 等が挙げられる。

【0026】なお、上記のFERM BP-1498の

菌株は、FERM BP-1497の菌株を親株としてDL- $\alpha$ -アミノ酪酸耐性を積極的に付与されたエタノール酸化性微生物である (特公昭59-28398号公報第3~4欄参照)。また、FERM BP-1500の菌株は、FERM BP-1497の菌株を親株としたL- $\alpha$ -アミノ酪酸トランスアミナーゼ高活性変異株である (特開昭62-5198号公報参照)。さらに、FERM BP-1499の菌株はFERMBP-1497の菌株を親株としたD- $\alpha$ -アミノ酪酸デアミナーゼ高活性変異株である (特開昭61-177993号公報参照)。

【0027】これらの微生物の他に、ブレヴィバクテリウム・アンモニアゲネス (Brevibacterium ammoniagenes) ATCC6871、同ATCC13745、同ATCC13746;ブレヴィバクテリウム・デバリカタム (Brevibacterium divaricatum) ATCC14020;ブレヴィバクテリウム・ラクトファーメンタム (Brevibacterium lactofermentum) ATCC13869;コリネバクテリウム・グルタミカム (Corynebacterium glutamicum) ATCC31831等を宿主微生物として用いることもできる。

【0028】なお、宿主としてブレヴィバクテリウム・フラバムMJ-233由来の菌株を用いる場合、本菌株が保有するプラスミドpBY502 (特開昭63-36787号公報参照) のため、形質転換が困難である場合があるので、そのような場合には、本菌株よりプラスミドpBY502を除去することが望ましい。そのようなプラスミドpBY502を除去する方法としては、例えば、継代培養を繰り返すことにより自然に欠失させることも可能であるし、人為的に除去することも可能である [Bact. Rev. 36 p. 361~405 (1972) 参照]。上記プラスミドpBY502を人為的に除去する方法の一例を示せば次のとおりである。

【0029】宿主ブレヴィバクテリウム・フラバムMJ-233の生育を不完全に阻害する濃度のアクリジンオレンジ (濃度: 0.2~50  $\mu$ g/ml) もしくはエチジウムブロミド (濃度: 0.2~50  $\mu$ g/ml) 等を含む培地に、1ml当たり約10細胞になるように植菌し、生育を不完全に阻害しながら約24時間約35℃で培養する。培養液を希釈後寒天培地に塗布し、約35℃で約2日培養する。出現したコロニーから各々独立にプラスミド抽出操作を行い、プラスミドpBY502が除去されている株を選択する。この操作によりプラスミドpBY502が除去されたブレヴィバクテリウム・フラバムMJ-233由来菌株が得られる。

【0030】このようにして得られるブレヴィバクテリウム・フラバムMJ-233由来菌株への前記プラスミドの形質転換法としては、エシェリヒア・コリ及びエルビ

ニア・カロトボラについて知られているように [Calvin, N. M. and Hanawalt, P. C., Journal of Bacteriology, 170, 2796 (1988); Ito, K., Nishida, T. and Izaki, K., Agricultural and Biological Chemistry, 52, 293 (1988) 参照]、DNA受容菌へのパルス波通電 [Sato, Y. et al., Journal of Industrial Microbiology, 5, 159 (1990) 参照] によりプラスミドを導入することが可能である。

【0031】上記の方法で形質転換して得られる sec Y 遺伝子産物産性能を有するコリネ型細菌、例えばプレバクテリウム・フラバム MJ-233 由来株の培養方法を以下に述べる。培養は炭素源、窒素源、無機塩等を含む通常の栄養培地で行うことができ、炭素源としては、例えばグルコース、エタノール、メタノール、蔗糖蜜等が、そして窒素源としては、例えばアンモニア、硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、硝酸アンモニウム、尿素等がそれぞれ単独もしくは混合して用いられる。また、無機塩としては、例えばリン酸一水素カリウム、リン酸二水素カリウム、硫酸マグネシウム等が用いられる。この他にペプトン、肉エキス、酵母エキス、コーンステイーブリカー、カザミノ酸、ビオチン等の各種ビタミン等の栄養素を培地に添加することができる。

【0032】培養は、通常、通気攪拌、振盪等の好気条件下に、約 20～約 40℃、好ましくは約 25℃～約 35℃の温度で行うことができる。培養途中の pH は 5～10、好ましくは 7～8 付近とすることができ、培養中の pH 調整は酸又はアルカリを添加して行うことができる。培養開始時の炭素源濃度は、好ましくは 1～5 容量%、更に好ましくは 2～3 容量%である。また、培養期間は通常 1～7 日間とすることができ、最適期間は 3 日間である。

【0033】かくして得られる培養物から遠心分離等により菌体を集めることにより、sec Y 遺伝子産物を高含有する菌体を取得することができる。

#### 【0034】

【実施例】以上に本発明を説明してきたが、下記の実施例によりさらに具体的に説明する。

#### 実施例 1

プレバクテリウム・フラバム MJ-233 由来の sec Y 遺伝子 DNA を含む DNA 断片 (A 断片) のクローニング

#### (A) プレバクテリウム・フラバム MJ-233 の全 DNA の抽出

半合成培地 A 培地 [組成: 尿素 2 g、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  7 g、 $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.5 g、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.5 g、 $\text{MgSO}_4$  0.5 g、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  6 mg、

$\text{MnSO}_4 \cdot 4\sim 6\text{H}_2\text{O}$  6 mg、酵母エキス 2.5 g、カザミノ酸 5 g、ビオチン 200  $\mu\text{g}$ 、塩酸チアミン 200  $\mu\text{g}$ 、グルコース 20 g、蒸留水 1 l] 1 l に、プレバクテリウム・フラバム MJ-233 (FERM BP-1497) を対数増殖期後期まで培養し、菌体を集めた。得られた菌体を 10 mg/ml の濃度にリゾチームを含む 10 mM NaCl-20 mM トリス緩衝液 (pH 8.0) -1 mM EDTA-2 Na 溶液 15 ml に懸濁した。次にプロテナーゼ K を、最終濃度が 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  になるように添加し、37℃で 1 時間保温した。さらにドデシル硫酸ナトリウムを最終濃度が 0.5% になるように添加し、50℃で 6 時間保温して溶菌した。この溶菌液に、等量のフェノール/クロロホルム溶液を添加し、室温で 10 分間ゆるやかに振盪した後、全量を遠心分離 (5,000  $\times g$ 、20 分間、10～12℃) し、上清画分を分取し、酢酸ナトリウムを 0.3 M となるように添加した後、2 倍量のエタノールをゆっくりと加えた。水層とエタノール層の間に存在する DNA をガラス棒でまきとり、70% エタノールで洗浄した後、風乾した。得られた DNA に 10 mM トリス緩衝液 (pH 7.5) -1 mM EDTA-2 Na 溶液 5 ml を加え、4℃で一晩静置し、以後の実験に用いた。

#### 【0035】(B) 組換え体の創製

上記 (A) 項で得たプレバクテリウム・フラバム MJ-233 の全 DNA 溶液の 90  $\mu\text{l}$  を制限酵素 EcoRI 50 units を用い、37℃で 1 時間反応させ完全分解した。この EcoRI 分解 DNA にクローニングベクター pUC118 (宝酒造より市販) を制限酵素 EcoRI で切断した後、脱リン酸化処理したものを混合し、50 mM トリス緩衝液 (pH 7.6)、10 mM ジチオスレイトール、1 mM ATP、10 mM  $\text{MgCl}_2$  及び  $\text{T}_4$  DNA リガーゼ 1 unit の各成分を添加し (各成分の濃度は最終濃度である)、4℃で 15 時間反応させ、結合させた。

【0036】上記 (B) 項で得られたプラスミド混液を用い、塩化カルシウム法 (Journal of Molecular Biology, 53, 159, 1970) によりエシェリヒア・コリ JM109 (宝酒造製) を形質転換し、アンピシリン 50 mg を含む培地 [トリプトン 10 g、イーストエキストラクト 5 g、NaCl 5 g 及び寒天 16 g を蒸留水 1 l に溶解] に塗抹した。

【0037】この培地上の生育株を常法により液体培養し、培養液よりプラスミド DNA を抽出し、該プラスミドを制限酵素により切断し、アガロースゲルを用いて泳動した。このアガロースゲルより DNA をナイロンメンブレン上に移しとり、エシェリヒア・コリ、バチルスサチルス由来 sec Y 遺伝子の共通領域をプローブとしてサザンハイブリダイゼーションを行なった。用いたプロ



ープとしては、エシェリヒア・コリ、バチルス・サチルス由来のsecY遺伝子から推定されるアミノ酸配列で特に相同性の高い領域に注目し、そのアミノ酸配列より想定される混合オリゴヌクレオチドプローブをアプライド・バイオシステムズ (Applied Biosystems) 社製394 DNA/RNAシンセサイザー (synthesizer) を用いて合成した。

【0038】実際に用いたプローブの塩基配列は、次のアミノ酸配列：

Ala Gly Val Ile Pro Val Ile Phe Ala

より想定される下記の塩基配列：

GCT GGT GTT ATH CCI GTT ATH TTY GC

(配列中、HはA又はC又はT、YはC又はTを示し、ここでAはアデニン、Gはグアニン、Cはシトシン、Tはチミン、Iはデオキシイノシンを示す。) の26mer (26塩基対) である。なお、プローブの合成にあたっては、混合の度合が著しくなりすぎぬようにデオキシイノシンを用いた。

【0039】合成した上記オリゴヌクレオチドプローブをT4ポリヌクレオチドキナーゼ (宝酒造社製) を用いる手法で、5' 末端リン酸基を [ $\gamma$ - $^{32}$ P] ATPでラジオアイソトープラベルした [Analytical Biochemistry, 158, 307-315, 1986]。サザンハイブリダイゼーションは、常法 [Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)] の通り行なった。この結果、ポジティブなバンドを生ずるクローンを選定することができ、プラスミドpUC118の長さ3.2kbのDNA断片に加え、長さ約4.2kbの挿入断片が認められた。

【0040】本プラスミドをpUC118-Y-fragと命名した。

(D) secY DNA遺伝子を含むDNA断片 (A) 断片のサブクロニング

第2表 プラスミドpUC118-secY

制限酵素	認識部位数	切断断片の大きさ (kb)
BamHI	1	4.7
SacI	2	4.1, 0.6
PstI	3	3.5, 0.7, 0.5

【0046】上記の制限酵素により特徴づけられるプラスミドをpUC118-secYと命名した。以上によりsecY遺伝子DNAを含む大きさが約1.5kbのDNA断片 (KpnI断片) を得ることができた。

#### 【0047】実施例2

secY遺伝子DNAの塩基配列の決定

実施例1の (D) 項で得られたsecY遺伝子DNAを含む長さが約1.5kbのDNA断片について、その塩基配列をプラスミドpUC118またはpUC119

(宝酒造製) を用いるジデオキシヌクレオチド酵素法

上記 (C) 項で得たプラスミドpUC118-Y-fragに含まれるDNA挿入断片を、必要な部分だけに小型化するために、プラスミドpUC118 (宝酒造より市販) へsecY遺伝子DNAを含むDNA断片を下記のとおりサブクロニングした。

【0041】上記 (C) 項で得たプラスミドpUC118-Y-fragを制限酵素KpnIで切断したものと、プラスミドpUC118を制限酵素KpnIで切断したものを混合し、50mMトリス緩衝液 (pH7.6)、10mMジチオスレイトール、1mM ATP、10mM MgCl<sub>2</sub> 及びT4DNAリガーゼ1 unitの各成分を添加し (各成分の濃度は最終濃度である)、12℃で15時間反応させ、結合させた。

【0042】得られたプラスミド混液を用い、塩化カルシウム法 (Journal of Molecular Biology, 53, 159, 1970) により前記エシェリヒア・コリJM109を形質転換し、アンピシリン50mgを含む培地 [トリプトン10g、イーストエキストラクト5g、NaCl 5g及び寒天16gを蒸留水1lに溶解] に塗抹した。

【0043】この培地上の生育株を常法により液体培養し、培養液よりプラスミドDNAを抽出し、該プラスミドを制限酵素により切断し、ハイブリダイゼーション法を用いて調べたところ、プラスミドpUC118の長さ3.2kbのDNA断片に加え、長さ約1.5kbの挿入DNA断片が認められた。各種の制限酵素で切断したときの、長さ約1.5kbのDNA断片の制限酵素認識部位数および切断断片の大きさは前記表1に示したとおりであった。このDNA断片の制限酵素切断点地図を図1に示す。

【0044】また上記で得たプラスミドを各種制限酵素で切断して、切断断片の大きさを測定した。その結果を下記の第2表に示す。

【0045】

【表2】

(dideoxychain termination 法) (Sanger, F. et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 74, 5463, 1977) により図2に示した戦略図に従って決定した。

【0048】その塩基配列中のオープンリーディングフレームの存在から、secY遺伝子DNAは、後記配列表の配列番号1に示す塩基配列を有する440個のアミノ酸をコードする1320の塩基対より構成されていることが判明した。

#### 【0049】実施例3

コリネ型細菌内で複製し安定なプラスミドベクターpCRY30の作成

(A) プラスミドpBY503の調製

プラスミドpBY503は、プレバクテリウム・スタチオニスIFO12144 (FERM BP-2515) から分離された分子量約10メガダルトンのプラスミドであり、特開平1-95785号公報に記載のようにして調製した。

【0050】半合成培地A培地〔尿素2g、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  7g、 $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.5g、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.5g、 $\text{MgSO}_4$  0.5g、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  6mg、 $\text{MnSO}_4 \cdot 4\sim 6\text{H}_2\text{O}$  6mg、酵母エキス2.5g、カザミノ酸5g、ピチオン200 $\mu\text{g}$ 、塩酸チアミン200 $\mu\text{g}$ 、グルコース20g及び蒸留水11〕11に、プレバクテリウム・スタチオニスIFO12144を対数増殖期後期まで培養し、菌体を集めた。得られた菌体を10mg/mlの濃度にリンチームを含む緩衝液〔25mMトリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン、10mM EDTA、50mMグルコース〕20mlに懸濁し、37℃で1時間反応させた。反応液にアルカリ-SDS液〔0.2N NaOH、1% (W/V) SDS〕40mlを添加し、緩やかに混和して室温にて15分間静置した。次に、この反応液に酢酸カリウム溶液〔5M酢酸カリウム溶液60ml、酢酸11.5ml、蒸留水28.5mlの混合液〕30mlを添加し、充分混和してから氷水中に15分間静置した。

【0051】溶菌物全量を遠心管に移し、4℃で10分間、15,000 $\times g$ の遠心分離にかけ、上澄液を得た。これに等量のフェノール-クロロホルム液(フェノール:クロロホルム=1:1混和液)を加え懸濁した後、遠心管に移し、室温下で5分間、15,000 $\times g$ の遠心分離にかけ、水層を回収した。水層に2倍量のエタノールを加え、-20℃で1時間静置後、4℃で10分間、15,000 $\times g$ の遠心分離にかけ、沈澱を回収した。

【0052】沈澱を減圧乾燥後、TE緩衝液〔トリス10mM、EDTA 1mM; HClにてpH8.0に調整〕2mlに溶解した。溶解液に塩化セシウム溶液〔5倍濃度のTE緩衝液100mlに塩化セシウム170gを溶解させた液〕15mlと10mg/mlエチジウムブロマイド溶液1mlを加えて、密度を1.392g/mlに合わせた。この溶液を12℃で42時間、116,000 $\times g$ の遠心分離を行った。

【0053】プラスミドpBY503は紫外線照射により遠心管内で下方のバンドとして見い出される。このバンドを注射器で遠心管の側面から抜きとることにより、プラスミドpBY503を含む分画液を得た。次いでこの分画液を等量のイソアミルアルコールで4回処理してエチジウムブロマイドを抽出除去し、その後TE緩衝

液に対して透析を行った。このようにして得られたプラスミドpBY503を含む透析液に3M酢酸ナトリウム溶液を最終濃度30mMに添加した後、2倍量エタノールを加え、-20℃1時間静置した。この溶液を15,000 $\times g$ の遠心分離にかけてDNAを沈降させ、プラスミドpBY503を50 $\mu\text{g}$ 得た。

【0054】(B) プラスミドベクターpCRY30の作成

プラスミドpHSG298(宝酒造製)0.5 $\mu\text{g}$ に制限酵素SalI(5units)を37℃1時間反応させ、プラスミドDNAを完全に分解した。前記(A)項で調製したプラスミドpBY503の2 $\mu\text{g}$ に制限酵素XhoI(1unit)を37℃で30分間反応させ、プラスミドDNAを部分分解した。両者のプラスミドDNA分解物を混合し、制限酵素を不活性化するために65℃で10分間加熱処理した後、該失活溶液中の成分が最終濃度として各々50mMトリス緩衝液pH7.6、10mM  $\text{MgCl}_2$ 、10mMジチオスレイトール、1mM ATP及びT4DNAリガーゼ1unitになるように各成分を強化し、16℃で15時間保温した。この溶液を用いてエシェリヒア・コリJM109コンピテントセル(宝酒造製)を形質転換した。

【0055】形質転換株は30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (最終濃度)のカナマイシン、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (最終濃度)のIPTG(イソプロピル- $\beta$ -D-チオガラクトピラノシド)100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (最終濃度)のX-gal(5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル- $\beta$ -D-ガラクトピラノシド)を含むL培地(トリプトン10g、酵母エキス5g、NaCl 5g及び蒸留水11、pH7.2)で37℃にて24時間培養し、生育株として得られた。これらの生育株のうち、白いコロニーで生育してきたものを選択し、各々プラスミドをアルカリ-SDS法〔T. Maniatis, E. F. Fritsch, J. Sambrook, "Molecular cloning" (1982), 90-91参照〕により抽出した。

【0056】その結果、プラスミドpHSG298のSalI部位にプラスミドpBY503由来の約4.0kbの断片が挿入されたプラスミドpHSG298-oriが得られた。次に同様の方法を用い、前記(A)項で得られたプラスミドpBY503DNAを制限酵素KpnI及びEcoRIにて処理して得られる約2.1kbのDNA断片を上記プラスミドpHSG298-oriのKpnI及びEcoRI部位にクローニングし、プラスミドベクターpCRY30を調製した。

【0057】実施例4

プラスミドpCRY30-secYの作成及びコリネ型細菌への導入

実施例1の(C)項で得られたプラスミドpUC118-secY5 $\mu\text{g}$ を制限酵素KpnIを各5units

用い、37℃で1時間反応させ分解したものと、実施例3の(B)項で得られたプラスミドpCRY30 1μgを制限酵素KpnI 1 unitを用い、37℃で1時間反応させ分解したものを混合し、50mMトリス緩衝液(pH7.6)、10mMジチオスレイトール、1mM ATP、10mM MgCl<sub>2</sub> およびT4DNAリガーゼ1 unitの各成分を添加し(各成分の濃度は最終濃度である)、12℃で15時間反応させ結合させた。このプラスミドを用いて、前記方法に従い前記エシエリヒア・コリJM109株を形質転換し、カナマイシン50μg/mlを含む培地〔トリプトン10g、イーストエキストラクト5g、NaCl 5g及び寒天16gを蒸留水1lに溶解〕に塗抹した。

【0058】この培地上の生育株を常法により液体培養し、培養液よりプラスミドDNAを抽出し、該プラスミドを制限酵素により切断し、アガロースゲル電気泳動を用いて調べたところ、プラスミドpCRY30の長さ8.6kbのDNA断片に加え、大きさ1.5kbの挿入DNA断片が認められた。上記の如く調製されたプラスミドDNAを、コリネ型細菌へ形質転換した。

【0059】形質転換は、電気パルス法を用いて次のとおり行った。プレバクテリウム・フラバムMJ-23

3 (FERM. BP-1497) プラスミドpBY502除去株を100mlの前記A培地で対数増殖初期まで培養し、ペニシリンGを1ユニット/mlになるように添加して、さらに2時間振盪培養し、遠心分離により菌体を集め、菌体を20mlのパルス用溶液(272mM Sucrose、7mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、1mM MgCl<sub>2</sub>; pH7.4)にて洗浄した。さらに菌体を遠心分離して集め、5mlのパルス用溶液に懸濁し、0.75mlの細胞と、前記で得られたプラスミドDNA溶液50μlとを混合し、水中にて20分間静置した。ジーンパルサー(バイオラ社製)を用いて、2500ボルト、25μFDに設定し、パルスを印加後水中に20分間静置した。全量を3mlの前記A培地に移し30℃にて1時間培養後、カナマイシン15μg/ml(最終濃度)を含む前記A寒天培地に植菌し30℃で2~3日間培養した。出現したカナマイシン耐性株より、前記実施例3(A)項に記載の方法を用いてプラスミドを得た。このプラスミドを各種制限酵素で切断して、切断断片の大きさを測定した。その結果を下記の第3表に示す。

【0060】

【表3】

第3表 プラスミドpCRY30-secY

制限酵素	認識部位数	切断断片の大きさ(kb)
EcoRI	1	10.1
BamHI	1	10.1
KpnI	2	8.6, 1.5
XhoI	1	10.1

【0061】上記制限酵素により特徴づけられるプラスミドをpCRY30-secYと命名した。なお、プラスミドpCRY30-secYにより形質転換されたプレバクテリウム・フラバムMJ233-secYは、茨城県つくば市東1丁目1番3号の工業技術院微生物工業技術研究所に、平成4年11月24日付で：微工研菌寄第13302号(FERM-13302)として寄託されている。

【0062】

【配列表】配列番号：1

配列の長さ：1320

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

起源

生物名：プレバクテリウム フラバム

株名：MJ233

配列の特徴

特徴を表す記号：peptide

存在位置：1-1320

特徴を決定した方法：P

配列

```

GTG TCC GCC ATT ATT CAG GCA TTC AAG GAC GCC GAT CTG CGT AAG AAG
Val Ser Ala Ile Ile Gln Ala Phe Lys Asp Ala Asp Leu Arg Lys Lys
1          5          10          15
ATT TTC TTC ACT ATC GCC ATG ATC GTT CTA TAC CGC ATC GGT GCG CAG
Ile Phe Phe Thr Ile Ala Met Ile Val Leu Tyr Arg Ile Gly Ala Gln
20          25          30
ATC CCT TCC CCG GGA GTT GAC TAT GCA ACG ATT AGT GGT CGT CTG CGT
Ile Pro Ser Pro Gly Val Asp Tyr Ala Thr Ile Ser Gly Arg Leu Arg
35          40          45
GAC TTG ACT CAG GAT CAG TCA AGC GTT TAT TCG CTG ATT AAC CTG TTT

```

Asp Leu Thr Gln Asp Gln Ser Ser Val Tyr Ser Leu Ile Asn Leu Phe  
 50 55 60  
 TCC GGT GGA GCG CTG CTG CAG CTG TCC ATT TTT GCT ATT GGT ATC ATG  
 Ser Gly Gly Ala Leu Leu Gln Leu Ser Ile Phe Ala Ile Gly Ile Met  
 65 70 75 80  
 CCG TAC ATC ACG GCG TCT ATT ATC GTG CAG CTG CTG ACT GTG GTT ATT  
 Pro Tyr Ile Thr Ala Ser Ile Ile Val Gln Leu Leu Thr Val Val Ile  
 85 90 95  
 CCA CAC TTT GAG GAG TTG AAG AAG GAA GGC CAG TCT GGC CAG GCC AAG  
 Pro His Phe Glu Glu Leu Lys Lys Glu Gly Gln Ser Gly Gln Ala Lys  
 100 105 110  
 ATG ATG CAG TAC ACC AGG TAC TTA ACG GTT GCC TTG GCG TTG CTT CAG  
 Met Met Gln Tyr Thr Arg Tyr Leu Thr Val Ala Leu Ala Leu Leu Gln  
 115 120 125  
 TCT TCG GGC ATC GTC GCG TTG GCG GAC CGT GAG CAG CTG CTT GGC GCA  
 Ser Ser Gly Ile Val Ala Leu Ala Asp Arg Glu Gln Leu Leu Gly Ala  
 130 135 140  
 GGC ATT CGC GTG CTG TCG GCT GAT CGC AAC TTC TTC GAC CTC ATT GTT  
 Gly Ile Arg Val Leu Ser Ala Asp Arg Asn Phe Phe Asp Leu Ile Val  
 145 150 155 160  
 TTG GTC ATC ACC ATG ACT GCG GGT GCA GTG CTT GTG ATG TGG ATG GGT  
 Leu Val Ile Thr Met Thr Ala Gly Ala Val Leu Val Met Trp Met Gly  
 165 170 175  
 GAG CTC ATC ACG GAA AAG GGC GTA GGC AAT GGT ATG TCG CTG CTG ATT  
 Glu Leu Ile Thr Glu Lys Gly Val Gly Asn Gly Met Ser Leu Leu Ile  
 175 180 185  
 TTC GCT GGT ATC GCA ACT CGC CTC CCA ACT GAT GGC ATG AAC ATT CTG  
 Phe Ala Gly Ile Ala Thr Arg Leu Pro Thr Asp Gly Met Asn Ile Leu  
 190 195 200  
 GGC AAC TCC GGC GGC GTG GTT TTC GCT GTT GTT CTG GCT TCC GTT CTG  
 Gly Asn Ser Gly Gly Val Val Phe Ala Val Val Leu Ala Ser Val Leu  
 205 210 215  
 ATC CTG GTC ATT GGT GTT GTA TTC GTT GAG CAG GGC CAG CGT CGT ATT  
 Ile Leu Val Ile Gly Val Val Phe Val Glu Gln Gly Gln Arg Arg Ile  
 220 225 230 235  
 CCA GTG CAG TAC GCA AAG GCG ATG GTG GGT CGT CGT CAG TAC GGT GGT  
 Pro Val Gln Tyr Ala Lys Arg Met Val Gly Arg Arg Gln Tyr Gly Gly  
 240 245 250  
 TCT TCC ACT TAC CTG OCT TTG AAG GTC AAC CAA GCT GGT GTT ATC CCA  
 Ser Ser Thr Tyr Leu Pro Leu Lys Val Asn Gln Ala Gly Val Ile Pro  
 255 260 265  
 GTG ATC TTC GCG TCT TCC TTG ATT TAC ATG CCA GTG CTG ATT ACT CAG  
 Val Ile Phe Ala Ser Ser Leu Ile Tyr Met Pro Val Leu Ile Thr Gln  
 270 275 280  
 ATC GTG AAC TCT GGT TCG CTG GAA GTG TCT GAT AAC TGG TGG CAG GCG  
 Ile Val Asn Ser Gly Ser Leu Glu Val Ser Asp Asn Trp Trp Gln Arg  
 285 290 295  
 AAC ATC ATT GCG CAC CTG CAG ACG OCT TCT TCC TGG CAG TAC ATT GTT  
 Asn Ile Ile Ala His Leu Gln Thr Pro Ser Ser Trp Gln Tyr Ile Val  
 300 305 310 315

TTG TAC TTT GCA CTG ACC ATC TTC TTC TCT TAC TTC TAT GTT TCT GTT  
 Leu Tyr Phe Ala Leu Thr Ile Phe Phe Ser Tyr Phe Tyr Val Ser Val  
 320 325 330  
 CAG TAT GAT CCA GCT GAG CAG GCT GAA AAC ATG AAG AAG TAC GGC GGA  
 Gln Tyr Asp Pro Ala Glu Gln Ala Glu Asn Met Lys Lys Tyr Gly Gly  
 335 340 345  
 TTT ATC CCT GGT ATT CGT CCG GGC CGT CCG ACT GCT GAG TAC TTG GGA  
 Phe Ile Pro Gly Ile Arg Pro Gly Arg Pro Thr Ala Glu Tyr Leu Gly  
 350 355 360  
 TTC GTC ATG AAC CGC CTG CTG TTT GTT GGT TCC CTG TAC CTG GCT GTC  
 Phe Val Met Asn Arg Leu Leu Phe Val Gly Ser Leu Tyr Leu Ala Val  
 365 370 375  
 ATT GCT GTG CTG CCA AAC ATT ATG CTG GAT CTA GGT GTT GAC GCC GGT  
 Ile Ala Val Leu Pro Asn Ile Met Leu Asp Leu Gly Val Asp Ala Gly  
 380 385 390 400  
 TCG GCC GGA GCA ACT CCA TTC GGC GGA ACC GCA ATC TTG ATT CTT GTA  
 Ser Ala Gly Ala Thr Pro Phe Gly Gly Thr Ala Ile Leu Ile Leu Val  
 405 410 415  
 TCT GTT GCA CTG ACC ACA GTG AAG CAG ATT GAG AGC CAG CTC CTG CAA  
 Ser Val Ala Leu Thr Thr Val Lys Gln Ile Glu Ser Gln Leu Leu Gln  
 420 425 430  
 AGC AAC TAC GAA GGA CTT CTA AAA TAA  
 Ser Asn Tyr Glu Gly Leu Leu Lys \*\*\*  
 435 440

【図面の簡単な説明】

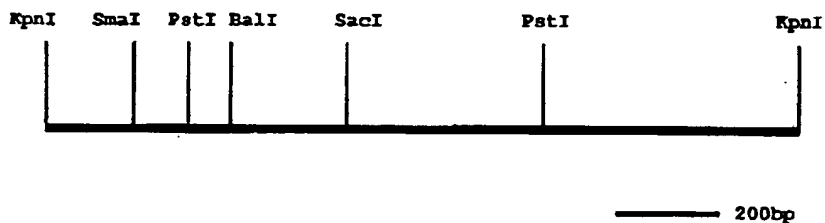
【図1】本発明のsecY遺伝子DNAを含むDNA断片の制限酵素による切断点地図。

【図2】大きさが約1.5kbの本発明のsecY遺伝

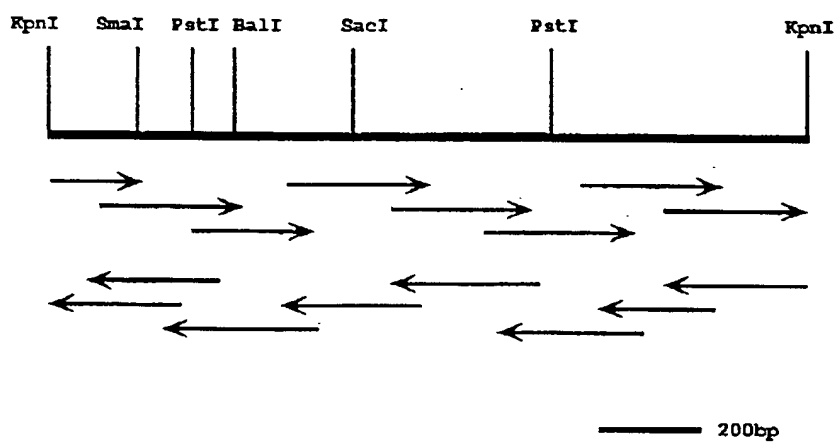
子DNAを含むDNA断片の塩基配列決定のための戦略図。

【図3】本発明のプラスミドpCRY30-secYの制限酵素の切断点地図。

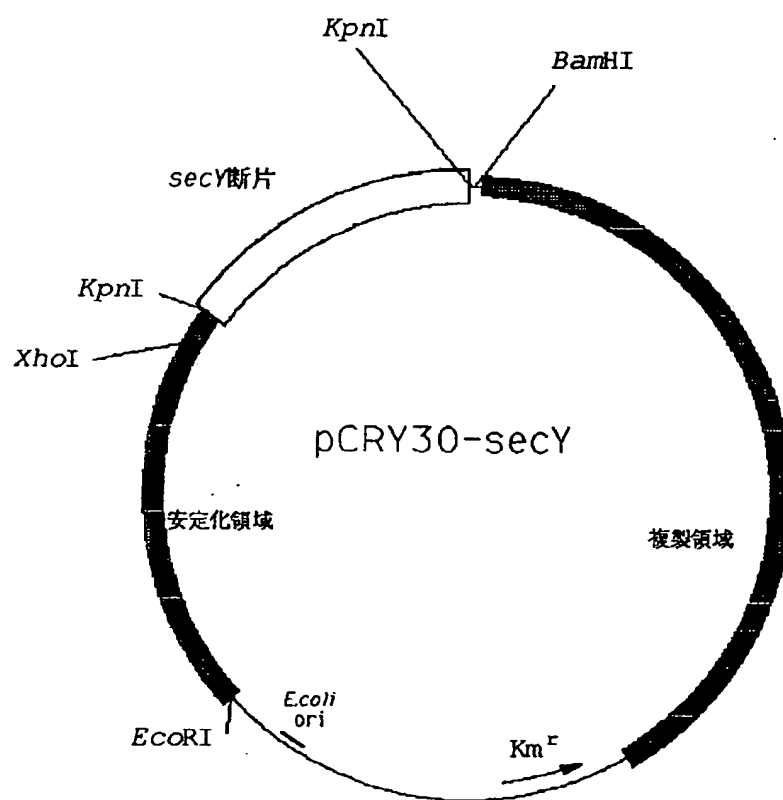
【図1】



【図2】



【図3】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. <sup>5</sup>

// C 1 2 P 21/02

(C 1 2 N 1/21

C 1 2 R 1:13)

(C 1 2 P 21/02

C 1 2 R 1:13)

識別記号 庁内整理番号

C 8214-4B

F I

技術表示箇所